两种纺织娘线粒体基因组的比较分析

周志军[1,*], 杨明茹[1,2], 常岩林[1], 石福明[1]

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 北京军区总医院生物治疗中心, 北京 100700)

摘要: 目前关于螽斯科昆虫的线粒体基因组全序列及其分子进化的研究报道很少。本研究利用 L-PCR 技术结合嵌套步移 PCR 扩增获得纺织娘 *Mecopoda elongata* 和日本纺织娘 *M. niponensis* 的线粒体基因组全序列, 同时对二者之间的碱基组成和结构特点进行了比较分析。结果显示: 纺织娘线粒体基因组(GenBank 登录号 JQ917910)序列全长 15 284 bp, A+T 含量 71.8%; 日本纺织娘线粒体基因组(GenBank 登录号 JQ917909)序列全长 15 364 bp, A+T 含量72.4%; 2 种纺织娘序列长度差异主要是控制区长度不同引起(纺织娘控制区长 294 bp, 日本纺织娘控制区长 393 bp)。2 种纺织娘基因组基因含量、相对位置及转录方向均与其他已报道的螽斯科昆虫一致, 未发现基因重排现象; 基因组中均存在较长的间隔序列, 在 *trnA/trnR* 之间的间隔序列长度分别为 63 bp 与 68 bp, 在 *trnQ/trnM* 之间的分别为 55 bp 和 26 bp, 在 $trnS^{UCN}$/*nad*1 之间的均为 21 bp。而最长的基因重叠区域在 2 种纺织娘 *trnC/trnW* 之间均为 8 bp, 在 *atp*8/*atp*6 和 *nad*4*L*/*nad*4*L* 之间均为 7 bp。蛋白质编码基因的碱基组成和密码子使用均具有明显的偏倚性; 除 *nad*1 和 *nad*2 以特殊的 TTG 作为起始密码子, *cox*1 使用特殊的起始密码子 ATGA 外, 其余的 10 种蛋白质编码基因均使用典型的 ATN 作为起始密码子。在 tRNA 基因中, 除 $trnS^{AGN}$外, 均能折叠形成典型的三叶草形二级结构。在这些 tRNA 基因中均存在一定数目的以 G-U 错配为主的碱基错配, 类似现象同样存在于其他已测定的六足动物线粒体基因组中, 表明 G-U 配对在线粒体基因组中很可能是一种完全正常的碱基配对方式。基因组中控制区的 A+T 含量略低于线粒体基因组的其他区域, 表明高 A+T 含量并不是该区域的必要特征。本研究结果为螽斯科系统发生关系重建积累了有价值的数据资料。

关键词: 直翅目; 螽斯科; 纺织娘; 日本纺织娘; 线粒体基因组; 序列分析

中图分类号: Q969　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2013)04-0408-11

Comparative analysis of mitochondrial genomes of two long-legged katydids (Orthoptera: Tettigoniidae)

ZHOU Zhi-Jun[1,*], YANG Ming-Ru[1,2], CHANG Yan-Lin[1], SHI Fu-Ming[1] (1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. Biotherapy Center, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China)

Abstract: Up to now, the reports about the complete mitochondrial genome of katydids and their corresponding molecular evolution are still limited. In this study, the mitochondrial genomes (mitogenome) of two long-legged katydids, *i. e.*, *Mecopoda elongata* and *M. niponensis*, were sequenced using the L-PCR combined with the sub-PCR technology. The results showed that the mitogenome sequence of *M. elongata* is 15 284 bp in length, haboring the A+T content of 71.8% (GenBank accession no.: JQ917910), while *M. niponensis* is 15 364 bp in length with the A+T content of 72.4% (GenBank accession no.: JQ917909). The differences in their mitogenome sizes can account for the size variations in their control regions (294 bp for *M. elongata* and 393 bp for *M. niponensis*). The organization and gene content of both two *Mecopoda* mitogenomes are identical with those of other studied Tettigoniidae species. A few of noteworthy larger non-coding regions are shared by both species: the first is between *trnA* and *trnR* (63 bp in *M. elongata*, and 68 bp in *M. niponensis*), the second between *trnQ* and *trnM* (55 bp in *M. elongata*, and 26 bp in *M. niponensis*), and the third between $trnS^{UCN}$ and *nad*1 (21 bp in both species). In both *Mecopoda* species, there are overlaps between *trnC/trnW* (8 bp), *atp*8/*atp*6 (7 bp) and *nad*4*L*/*nad*4*L* (7 bp). AT nucleotide composition bias of both *Mecopoda*

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101632); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20101301120006); 中国博士后科学基金资助项目(2011M500671)

作者简介: 周志军, 男, 1980 年生, 山西长治人, 博士, 讲师, 研究方向为直翅目分子进化与系统发育, E-mail: zhijunzhou@163.com; zhijunzhou@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhijunzhou@163.com; zhijunzhou@yeah.net

收稿日期 Received: 2012-12-16; 接受日期 Accepted: 2013-02-14

mitogenomes is also reflected in the codon usage of NNU or NNA bias. In both *Mecopoda* mitogenomes, all protein-coding genes (PCGs) start with the typical ATN initiator codon expcept for *nad*1 and *nad*2 with TTG and *cox*1 with ATGA. All tRNAs in both *Mecopoda* species have the typical clover leaf structure except for $trnS^{AGN}$. Some unmatched base pairs occur in both *Mecopoda* species, and overwhelming majority of them are G-U pairs, indicating that G-U is a normal base-pairing model in insect mitogenomes. Another unusual feature is the relatively lower A + T content of control region (CR) compared with other regions of the mitogenomes, underlining the fact that high A + T content is not characteristic of this control region. The results of this study provide some valuable molecular data for clarifying the intra-subfamilies phylogenetic relationship in Tettigoniidae.

Keywords: Orthoptera; Tettigoniidae; *Mecopoda elongata*; *Mecopoda niponensis*; mitochondrial genome; sequence analysis

六足动物线粒体基因组是一长度约 14 ~ 17 kb 的双链闭合环状 DNA 分子，共编码 37 个基因：13 个蛋白质编码基因(*atp*6，*atp*8，*cox*1 ~ 3，*nad*1 ~ 6，*nad*4*L* 和 *cytb*)，2 个核糖体 RNA 基因(*rrnL* 和 *rrnS*)，22 个 tRNA 基因，及 1 个非编码的控制区(Wolstenholme，1992；Boore，1999)。

自 1985 年果蝇 *Drosophila yakuba* 线粒体基因组全序列完成测定至今，关于线粒体基因组的测定策略主要有以下几种：1)采用密度梯度离心或差速离心技术分离获得纯度较低的线粒体后，再通过 DNase 消化附着在线粒体表面的核 DNA，并获得高纯度的 mtDNA(Gellissen *et al*.，1983；Tamura and Aotsuka，1988；Saito *et al*.，2005)，再采取酶切、超声破碎等方式将 mtDNA 破碎、回收并克隆测序(Gellissen *et al*.，1983；Crozier and Crozier，1993；鲁成等，2002)，或者以 mtDNA 作为模板进行常规 PCR 扩增并测序；2)直接以总 DNA 作为模板进行普通 PCR 扩增并测序(Friedrich and Muqim，2003；Lee *et al*.，2006)；3)采用 L-PCR 技术将线粒体基因组扩增为几个相互重叠的大片段，再以 L-PCR 扩增产物作为模板进行普通 PCR 扩增并测序(Yamauchi *et al*.，2004；Kim *et al*.，2005)。而基于 L-PCR 技术进行线粒体基因组测序的策略可以分为两类，一类是根据近缘种信息直接设计类群特异性 L-PCR 引物进行扩增(刘念等，2006；Zhou *et al*.，2007)；另一类是先采用通用引物对几个小片段进行扩增测序，然后再根据所获得的序列信息设计物种特异性 L-PCR 引物进行扩增(Kim *et al*.，2005；Fenn *et al*.，2007)。由于多数六足动物体型较小，单头标本难以满足 mtDNA 分离需要；而以总 DNA 作为模板直接进行常规 PCR 扩增并测序的方法，由于核内线粒体假基因的存在，使得测序质量难以保证，致使六足动物线粒体基因组的研究一度明显落后于其他体型较大的动物类群。

近年来，随着 L-PCR 技术的引入，大量六足动物线粒体基因组不断被测出(黄原等，2010)。为了更好地研究螽斯科的起源、进化和系统发育，我们先后对螽斯科 5 亚科 6 种线粒体基因组进行了测定，分别是：螽斯亚科(Tettigoniinae)的优雅蝈螽 *Gampsocleis gratiosa* (EU527333) (Zhou *et al*.，2008)，硕螽亚科(Bradyporinae)的北方棘螽 *Deracantha onos* (EU137664) (Zhou *et al*.，2009)，露螽亚科(Phaneropterinae)的陈氏掩耳螽 *Elimaea cheni* (GU323362) (Zhou *et al*.，2010)，草螽亚科(Conocephalinae)的疑钩额螽 *Ruspolia dubia* (EF583824) (Zhou *et al*.，2007)和斑翅草螽 *Conocephalus maculatus* (HQ711931) (Zhou *et al*.，2011)，蛩螽亚科(Meconematinae)的斑腿栖螽 *Xizicus fascipes* (JQ326212) (Yang *et al*.，2012)，此外，Fenn 等(2007)对螽斯亚科的 *Anabrus simplex* (EF373911)线粒体基因组进行了测定。

纺织娘亚科(Mecopodinae)在我国仅记载 1 属 2 种。纺织娘 *Mecopoda elongata* 和日本纺织娘 *M. niponensis*，是我国鸣虫市场上常见的种类，具有十分悠久的人工饲养历史。目前，尚未见该亚科的线粒体基因组序列报道。为了进一步明确螽斯科各亚科间线粒体基因组组成上的差异，同时为后期基于线粒体基因组数据的螽斯科亚科间的系统发育关系重建积累数据资料，我们对分布于我国的这 2 种纺织娘线粒体基因组进行了测定，并进行了初步比较分析。

1　材料与方法

1.1　供试材料

纺织娘 *M. elongata* 标本于 2010 年 8 月采集于

广西靖西(23°15′N, 106°41′E)；日本纺织娘 *M. niponensis* 标本于 2008 年 7 月采集于江西南昌(28°68′N, 115°89′E)。

1.2 DNA 提取

取单头雄性成虫后足股节肌肉，使用天根基因组 DNA 提取试剂盒，按照使用说明提取总 DNA。

1.3 L-PCR 扩增

首先，采用通用引物对 2 种纺织娘 3 个线粒体短片段(*cox*1, *cox*2 和 *cytb*)进行扩增并测序(Simon *et al.*, 2006)。然后，根据所获得的序列信息，将刘念等(2006)所报道的 L-PCR 引物修改为 2 种纺织娘特异性引物 LPA-J2123/LPA-N11240 和 LPB-J11184/LPB-N3651(表 1)。并利用上述引物将纺织娘线粒体基因组扩增为 A (9 kb, *cox*1→*cytb*) 和 B (7.5 kb, *cytb*→*cox*2) 两个相互重叠的大片段。25 μL L-PCR 反应体系：12.5 μL Premix LA Taq Hot Start (宝生物, 大连)，正反向引物各 1 μL (10 μmol/L)，3 μL 总 DNA 模板，去离子水补足。A 片段反应条件：94℃ 预变性 1 min；98℃ 变性 10 s, 48℃退火 30 s, 68℃ 延伸 10 min, 共 30 个循环；68℃延伸 10 min。B 片段反应条件：94℃ 预变性 1 min；98℃变性 10 s, 62℃退火及延伸 15 min, 共 30 个循环；68℃延伸 10 min。

日本纺织娘扩增策略与纺织娘类似，不同之处在于根据纺织娘测序结果和 GenBank 数据库中其他螽斯科线粒体基因组数据增设两条引物(表 1)，将 A 片段分为 A1 和 A2 两个较小的片段进行扩增。具体引物配对情况如下，A1：LPA-J2123/N5-N7793，扩增区域 5.5 kb，*cox*1→*nad*5；A2：TF-J6400/LPA-N11240，扩增区域 5.5 kb，*trnF*→*cytb* 和 LPB-J11184 /LPB-N3651，扩增区域 7.5 kb，*cytb*→*cox*2。除根据引物设置退火温度外，反应体系及条件与纺织娘 L-PCR 相同。

表 1 L-PCR 使用的引物序列

Table 1 List of L-PCR primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5′-3′) Primer sequence
LPA-J2123	CATTTATTTTGATTCTTTGGTCACCCAGAAGTC
LPA-N11240	ATAGCGTAAGCAAATAAAAAGTATCATTCTGG
LPB-J11184	AGTTACYCCTGTYCATATTCAACCWGAATGAT
LPB-N3651	TGATTGGCCCCACAAATTTCTGAACATTGACC
N5-N7793	TTAGGTTGAGATGGATTAGG
TF-J6400	TAACATCTTCAGTGTYATRCTCT

1.4 Sub-PCR 扩增与测序

以经过琼脂糖凝胶电泳切胶纯化后的 L-PCR 扩增产物为模板，分别利用已测定的短片段信息和 GenBank 数据库中收录的螽斯科线粒体基因组序列数据对已报道的线粒体基因组通用引物(Folmer *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1994, 2006)进行修改，设计引物进行第一轮扩增和测序。然后，再根据新测定的序列信息，设计引物进行第二轮扩增和测序，依次反复，直至覆盖整个线粒体基因组。所有 Sub-PCR 扩增片段全部采用克隆法进行双向测序，克隆载体为 pMD®-19T(大连，宝生物)，测序公司为上海铂尚生物技术有限公司。

1.5 序列拼接、注释和分析

测序结果经 Staden 序列分析软件包(Staden *et al.*, 2000)去除载体序列、拼接后以 Fasta 格式输出，然后采用序列比对的方法切除重叠区域、调零(Thompson *et al.*, 1997)，使用 MOSAS 进行基因组注释(Sheffield *et al.*, 2010)。使用 MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)对线粒体基因组碱基成及蛋白质编码基因密码子使用情况进行统计。

2 结果与分析

2.1 2 种纺织娘线粒体基因组特征

2 种纺织娘线粒体基因组序列已提交 GenBank 数据库，纺织娘线粒体基因组 GenBank 登录号为 JQ917910，序列全长 15 284 bp，A + T 含量 71.8%；日本纺织娘线粒体基因组 GenBank 登录号 JQ917909，序列全长 15 364 bp，A + T 含量 72.4%。2 种纺织娘线粒体基因组序列长度差异主要由控制区的长度不同引起。基因组的基因组成、排列都与典型的节肢动物线粒体基因组一致，37 个编码基因中，N 链编码 14 个基因，包括 4 个蛋白质编码基因(*nad*1, *nad*4, *nad*4*L* 和 *nad*5)，8 个 tRNA 基因(*trnQ*, *trnC*, *trnY*, *trnF*, *trnP*, *trnL*, *trnH* 和 *trnV*)和 2 个 rRNA 基因(*rrnL* 和 *rrnS*)，其余 23 个基因则由 J 链编码(表 2)(Clary and Wolstenholme, 1985; Boore, 1999)。

线粒体基因组基因之间排列紧凑，除控制区外，纺织娘基因间间隔序列总长度为 201 bp，分布在 14 处基因对之间，长度介于 1～63 bp，其中，长度超过 10 bp 的基因间间隔序列 5 处，分别为：11 bp *trnY* / *cox*1, 15 bp *cytb* / $trnS^{UCN}$, 21 bp *nad* 1 /

表 2　2 种纺织娘线粒体基因组组成

Table 2　Organization of the mitogenomes of two *Mecopoda* species

基因 Gene	方向 Direction	纺织娘 *M. elongata* 位置 Position	长度(bp) Size	起始/终止密码子 Start/stop codon	反密码子 Anticodon	A+T 含量(%) A+T content	日本纺织娘 *M. niponensis* 位置 Position	长度(bp) Size	起始/终止密码子 Start/stop codon	反密码子 Anticodon	A+T 含量(%) A+T content	序列一致性(%) Sequence identity
trnI	F	1－67	67		GAT	71.6	1－67	67		GAT	73.1	97.0
trnQ	R	65－133	69		TTG	79.7	65－133	69		TTG	81.2	95.7
trnM	F	189－253	65		CAT	66.2	160－225	66		CAT	66.7	98.5
nad2	F	257－1285	1 029	TTG/TAA		75.4	226－1257	1 032	TTG/TAA		78.0	88.5
trnW	F	1 288－1 354	67		TCA	79.1	1 261－1 327	67		TCA	79.1	97.0
trnC	R	1 347－1 412	66		GCA	68.1	1 320－1 390	71		GCA	64.8	95.5
trnY	R	1 418－1 481	64		GTA	65.6	1 396－1 462	67		GTA	70.2	91.0
cox1	F	1 493－3 023	1 531	ATGA/TAA		67.0	1 475－3 005	1 531	ATGA /TAA		67.1	93.1
trnL^{UUR}	F	3 019－3 083	65		TAA	73.8	3 001－3 065	65		TAA	72.3	96.9
cox2	F	3 086－3 776	691	ATG/T		68.5	3 068－3 758	691	ATG/T		67.4	91.2
trnK	F	3 777－3 846	70		CTT	64.3	3 759－3 828	70		CTT	62.9	98.6
trnD	F	3 846－3 911	66		GTC	84.8	3 828－3 893	66		GTC	83.3	95.5
atp8	F	3 912－4 073	162	ATA/TAA		74.7	3 894－4 055	162	ATA/TAA		73.4	82.1
atp6	F	4 067－4 744	678	ATG/TAA		69.6	4 049－4 726	678	ATG/TAA		69.6	89.5
cox3	F	4 744－5 541	798	ATA/TAA		66.2	4 726－5 523	798	ATA/TAA		65.6	89.1
trnG	F	5 545－5 609	65		TCC	78.5	5 527－5 590	64		TCC	81.3	95.4
nad3	F	5 610－5 963	354	ATT/TAA		71.4	5 591－5 944	354	ATT/TAA		72.3	90.4
trnA	F	5 964－6 026	63		TGC	73.0	5 944－6 006	63		TGC	71.4	98.4
trnR	F	6 090－6 152	63		TCG	61.9	6 075－6 137	63		TCG	66.7	92.1
trnN	F	6 162－6 225	64		GTT	75.0	6 143－6 206	64		GTT	79.7	95.3
trnS^{AGN}	F	6 228－6 295	68		GCT	76.4	6 209－6 276	68		GCT	75.0	97.1
trnE	F	6 305－6 371	67		TTC	89.6	6 280－6 345	66		TTC	89.4	95.5
trnF	R	6 372－6 438	67		GAA	65.7	6 360－6 426	67		GAA	64.2	95.5
nad5	R	6 439－8 170	1 732	ATT/T		73.8	6 427－8 158	1 732	ATT/T		75.0	90.9
trnH	R	8 171－8 236	66		GTG	77.3	8 159－8 224	66		GTG	78.8	89.4

续表 2 Table 2 continued

基因 Gene	方向 Direction	纺织娘 *M. elongata*					日本纺织娘 *M. niponensis*					序列一致性(%) Sequence identity
		位置 Position	长度(bp) Size	起始/终止密码子 Start/stop codon	反密码子 Anticodon	A+T 含量(%) A+T content	位置 Position	长度(bp) Size	起始/终止密码子 Start/stop codon	反密码子 Anticodon	A+T 含量(%) A+T content	
nad4	R	8 237 – 9 575	1 339	ATG/T		73.0	8 225 – 9 563	1 339	ATG/T		73.9	89.7
nad4L	R	9 569 – 9 865	297	ATG/TAA		75.9	9 557 – 9 853	297	ATG/TAG		76.8	89.6
trnT	F	9 872 – 9 936	65		TGT	76.9	9 860 – 9 924	65		TGT	78.4	92.3
trnP	R	9 936 – 10 003	68		TGG	70.6	9 924 – 9 991	68		TGG	69.1	85.5
nad6	F	10 005 – 10 526	522	ATT/TAA		75.5	9 993 – 10 514	522	ATT/TAA		77.6	88.1
cytb	F	10 526 – 11 677	1 152	ATG/TAA		67.2	10 514 – 11 669	1 156	ATG/T		68.5	88.2
$trnS^{UCN}$	F	11 693 – 11 761	69		TGA	76.8	11 671 – 11 739	69		TGA	76.8	97.1
nad1	R	11 783 – 12 733	951	TTG/TAG		73.4	11 761 – 12 711	951	TTG/TAG		72.9	89.5
$trnL^{CUN}$	R	12 734 – 12 800	67		TAG	68.7	12 712 – 12 777	66		TAG	72.7	91.0
rrnL	R	12 801 – 14 134	1 334			75.4	12 778 – 14 115	1 338			75.5	93.3
trnV	R	14 135 – 14 203	69		TAC	65.2	14 116 – 14 184	69		TAC	60.8	92.8
rrnS	R	14 204 – 14 990	787			71.5	14 185 – 14 971	787			71.9	94.4
CR		14 991 – 15 284	294			71.5	14 972 – 15 364	393			69.5	37.7

F：正向 Forward；R：反向 Reverse；CR：控制区 Control region.

trnS[UCN], 55 bp *trnQ/trnM*, 63 bp *trnA/trnR*。日本纺织娘基因间间隔序列总长度为 172 bp，分布在 15 处基因对之间，长度介于 1～68 bp，其中，长度超过 10 bp 的基因间间隔序列 5 处，分别为：12 bp *trnY/cox*1, 14 bp *trnE/trnF*, 21 bp *nad*1/*trnS*[UCN], 26 bp *trnQ/trnM* 之间, 68 bp *trnA/trnR*。

在另外一些基因之间存在少量碱基重叠。其中，纺织娘线粒体基因组中共存在56 bp 碱基重叠，分布在 9 处基因对之间，长度介于 1～8 bp。日本纺织娘线粒体基因组中共存在 57 bp 碱基重叠，分布在 10 处基因对之间，长度介于 1～8 bp。在 2 种纺织娘线粒体基因组中最大的碱基重叠均出现在 *trnC/trnW* 之间，此外，*atp*8/*atp*6（ATGATAA）和 *nad*4/*nad*4*L*（ATGTTAA）均存在 7 bp 碱基重叠，其余几处大于 1 bp 的基因重叠序列分别为 *cox*1/*trnL*[UUR]（5 bp）和 *trnI/trnQ*（3 bp）。

2.2　2 种纺织娘线粒体基因组的蛋白质编码基因

2 种纺织娘线粒体基因组的 11 种蛋白质编码基因的起始及终止密码子均一致（表 2），其中，8 种使用典型的 ATN 作为起始密码子，分别为：ATT（*nad*3, *nad*5 和 *nad*6）、ATG（*cox*2, *atp*6 和 *nad*4）和 ATA（*atp*8 和 *cox*3）；*nad*1 和 *nad*2 均以特殊的密码子 TTG 作为起始密码子；*cox*1 则使用一种特殊的起始密码子 ATGA。上述 11 种蛋白质编码基因中，除 *nad*1 以 TAG 以及 *cox*2, *nad*4 和 *nad*5 使用不完整的终止密码子 T 外，其余 7 种蛋白质编码基因的终止密码子均为 TAA。其余两个基因 *nad*4*L* 和 *cytb* 起始密码子均为 ATG；而终止密码子不同，纺织娘 *nad*4*L* 和 *cytb* 均为 TAA，日本纺织娘 *nad*4*L* 为 TAG，*cytb* 为不完整终止密码子 T。2 种纺织娘之间差异最大的蛋白质编码基因是 *atp*8，一致性为 82.1%；差异最小的是 *cox*1，一致性为 93.1%。

2 种纺织娘线粒体基因组蛋白质编码基因均具有很高的 AT 偏向性（表 3），其中，纺织娘 A + T 含量为 71.1%，密码子第 3 位点处 A + T 含量（83.9%）显著高于第 1 位点（64.9%）和第 2 位点（64.4%）；日本纺织娘 A + T 含量为 71.7%，密码子第 3 位点处 A + T 含量（85.1%）显著高于第 1 位点（65.2%）和第 2 位点（64.9%）。

2 种纺织娘线粒体基因组蛋白质编码基因的密码子使用情况如表 3 所示。除终止密码子外，纺织娘包含 3 733 个密码子，日本纺织娘包含 3 736 个密码子。从表 4 可以看出使用频率最高的密码子其第 2 位点多为 U 和第 3 位点多为 U 或 A。在所有密码子中，UUA 在 2 种纺织娘中的使用频率及相对密码子使用频率均最高，n（RSCU）值在纺织娘中高达414（3.91），日本纺织娘中为409（3.93）。组成最高前 4 的氨基酸分别为：亮氨酸（Leu）> 丝氨酸（Ser）> 苯丙氨酸（Phe）> 异亮氨酸（Ile）的含量相对较高，在纺织娘中这 4 种氨基酸总量占 42.89%，上述 4 种氨基酸含量分别为 17.01%，9.08%，8.47% 和 8.33%；日本纺织娘中这 4 种氨基酸总量占 43.04%，分别为 16.73%，9.02%，8.89% 和 8.40%。含量最低的氨基酸均为半胱氨酸（Cys），在纺织娘中仅占 1.10%，在日本纺织娘中仅占 1.12%。

2.3　2 种纺织娘线粒体基因组的 tRNA 基因和 rRNA 基因

2 种纺织娘线粒体基因组中 22 个 tRNA 基因的相对位置、反密码子均与已报道的螽斯科种类和果蝇 *D. yakuba* 相同（Clary and Wolstenholme, 1985）。在这 22 个 tRNA 基因中，除 *trnS*[AGN] 外，其余 21 个均能折叠形成典型的三叶草结构（图 1）。*trnS*[AGN] 的二级结构则依据 Steinberg 等（1997）发表的线粒体特殊 tRNA 结构类型-9 绘制。2 种纺织娘之间，差异最大的 tRNA 基因是 *trnP*，一致性为 85.5%；最小的是 *trnK*，一致性 98.6%。

纺织娘线粒体基因组 22 个 tRNA 基因中，共存在 31 处碱基错配，其中，23 处为 G-U 配对，其余 8 处错配分别为：5 处 U-U 错配，1 处位于 *trnQ* 的 TψC 臂，2 处位于 *trnQ* 和 *trnA* 的氨基酸接受臂，其余 2 处分布于 *trnG* 和 *trnS*[AGN] 的反密码子臂；3 处 U-C 错配，分布于 *trnK*, *trnR* 和 *trnF* 的反密码子臂。

日本纺织娘线粒体基因组中，共存在 34 处碱基错配，其中，25 处为 G-U 配对，其余 9 处错配分别为：5 处 C-U 错配，1 处位于 *trnV* 的 TψC 臂，1 处位于 *trnS*[UCN] 的氨基酸接受臂，其余 3 处分别分布于 *trnK*, *trnR* 和 *trnF* 的反密码子臂；3 处 U-U 错配，1 处位于 *trnQ* 的 TψC 臂，1 处位于 *trnL*[UUR] 的氨基酸接受臂，剩余 1 处分布于 *trnG* 的反密码子臂；1 处 C-A 错配，分布于 *trnT* 的反密码子臂。

2 种纺织娘中的 rRNA 基因（*rrnL* 和 *rrnS*）同其他昆虫一样，均位于 *trnL*[CUN] 和 *trnV*, *trnV* 和控制区 CR 之间，纺织娘中 *rrnL* 和 *rrnS* 的长度分别为 1 334 bp 和 787 bp，A + T 含量分别为 75.4% 和 71.5%；日本纺织娘中 *rrnL* 和 *rrnS* 的长度分别是 1 338 bp 和 787 bp，A + T 含量分别为 75.5% 和 71.9%。2 种纺织娘中 *rrnL* 的 A + T 含量均高于基因组的平均

水平及其他组分(tRNA、*rrnS*、蛋白质编码基因及控制区 CR)。2 种纺织娘之间 *rrnS* 基因的一致性(94.4%)略高于 *rrnL*(93.3%)。

表 3 2 种纺织娘线粒体基因组蛋白质编码基因的密码子使用

Table 3 Codon usage in protein-coding genes of the mitogenomes of two *Mecopoda* species in this study

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	n (RSCU)		氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	n (RSCU)	
		纺织娘 *M. elongata*	日本纺织娘 *M. niponensis*			纺织娘 *M. elongata*	日本纺织娘 *M. niponensis*
Phe	UUU	260(1.65)	275(1.66)	Pro	CCU	84(2.30)	89(2.46)
	UUC	56(0.35)	57(0.34)		CCC	12(0.33)	14(0.39)
Leu	UUA	414(3.91)	409(3.93)		CCA	43(1.18)	39(1.08)
	UUG	49(0.46)	36(0.35)		CCG	7(0.19)	3(0.08)
	CUU	97(0.92)	91(0.87)	Thr	ACU	85(1.57)	100(1.90)
	CUC	18(0.17)	15(0.14)		ACC	36(0.67)	20(0.38)
	CUA	52(0.49)	67(0.64)		ACA	86(1.59)	84(1.60)
	CUG	5(0.05)	7(0.07)		ACG	9(0.17)	6(0.11)
Ile	AUU	278(1.79)	278(1.77)	Ala	GCU	97(1.95)	96(1.97)
	AUC	33(0.21)	36(0.23)		GCC	21(0.42)	21(0.43)
Met	AUA	193(1.78)	204(1.81)		GCA	72(1.45)	73(1.50)
	AUG	24(0.22)	22(0.19)		GCG	9(0.18)	5(0.10)
Val	GUU	88(1.72)	98(1.95)	Cys	UGU	37(1.80)	36(1.71)
	GUC	20(0.39)	13(0.26)		UGC	4(0.20)	6(0.29)
	GUA	81(1.58)	79(1.57)	Trp	UGA	86(1.62)	87(1.64)
	GUG	16(0.31)	11(0.22)		UGG	20(0.38)	19(0.36)
Tyr	UAU	131(1.64)	129(1.61)	Arg	CGU	19(1.36)	15(1.03)
	UAC	29(0.36)	31(0.39)		CGC	2(0.14)	1(0.07)
Ter.*	UAA	12(1.85)	11(1.69)		CGA	25(1.79)	29(2.00)
	UAG	1(0.15)	2(0.31)		CGG	10(0.71)	13(0.90)
His	CAU	60(1.54)	53(1.41)	Ser	UCU	91(2.15)	106(2.52)
	CAC	18(0.46)	22(0.59)		UCC	29(0.68)	22(0.52)
Gln	CAA	70(1.79)	70(1.82)		UCA	91(2.15)	85(2.02)
	CAG	8(0.21)	7(0.18)		UCG	8(0.19)	6(0.14)
Asn	AAU	136(1.55)	151(1.70)		AGU	52(1.23)	50(1.19)
	AAC	40(0.45)	27(0.30)		AGC	9(0.21)	9(0.21)
Lys	AAA	55(1.43)	63(1.59)		AGA	57(1.35)	58(1.38)
	AAG	22(0.57)	16(0.41)		AGG	2(0.05)	1(0.02)
Asp	GAU	54(1.54)	57(1.61)	Gly	GGU	68(1.21)	61(1.10)
	GAC	16(0.46)	14(0.39)		GGC	11(0.20)	15(0.27)
Glu	GAA	70(1.71)	64(1.52)		GGA	100(1.78)	97(1.76)
	GAG	12(0.29)	20(0.48)		GGG	46(0.82)	48(0.87)

n: 某一密码子使用次数 Number of occurrences of each codon; RSCU: 相对同义密码子使用频率 Relative synonymous codon usage; Ter.: 终止密码子 Termination codon. * 在密码子使用计算过程中不完整终止密码子 T 视为 TAA (Incomplete termination codon T is seen as TAA in codon usage count).

表 4　螽斯科线粒体基因组特征

Table 4　Characteristics of the mitogenomes of Tettigoniidae

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	长度(bp) Size	A + T 含量 A + T content (%)							
			基因组 Mitogenome	蛋白质编码基因 Protein coding genes	密码子第 1 位点 1st position of codon	密码子第 2 位点 2nd position of codon	密码子第 3 位点 3rd position of codon	核糖体 RNA rRNA	转运 RNA tRNA	控制区 Control region
纺织娘 *Mecopoda elongata*	JQ917910	15 284	71.8	71.1	64.9	64.4	83.9	73.9	73.2	71.4
日本纺织娘 *Mecopoda niponensis*	JQ917909	15 364	72.4	71.7	65.2	64.9	85.1	74.2	73.4	69.5
斑腿栖螽 *Xizicus fascipes*	JQ326212	16 166	70.2	69.5	64.3	64.6	79.5	73.9	74.3	65.5
优雅蝈螽 *Gampsocleis gratiosa*	EU527333	15 929	65.3	63.5	60.5	63.7	66.2	69.1	71.5	67.4
Anabrus simplex	EF373911	15 766	69.4	67.6	63.0	64.0	76.1	70.9	73.0	80.1
北方棘螽 *Deracantha onos*	EU137664	15 650	69.2	67.7	63.4	64.4	75.6	71.4	72.2	77.8
疑钩额螽 *Ruspolia dubia*	EF583824	14 971	70.8	69.8	63.9	64.0	81.6	73.5	73.4	71.4
斑翅草螽 *Conocephalus maculatus*	HQ711931	15 898	72.1	70.9	64.7	64.8	83.3	73.9	73.5	79.0
陈氏掩耳螽 *Elimaea cheni*	GU323362	15 831	72.6	71.5	65.9	64.9	83.6	75.6	74.0	75.5

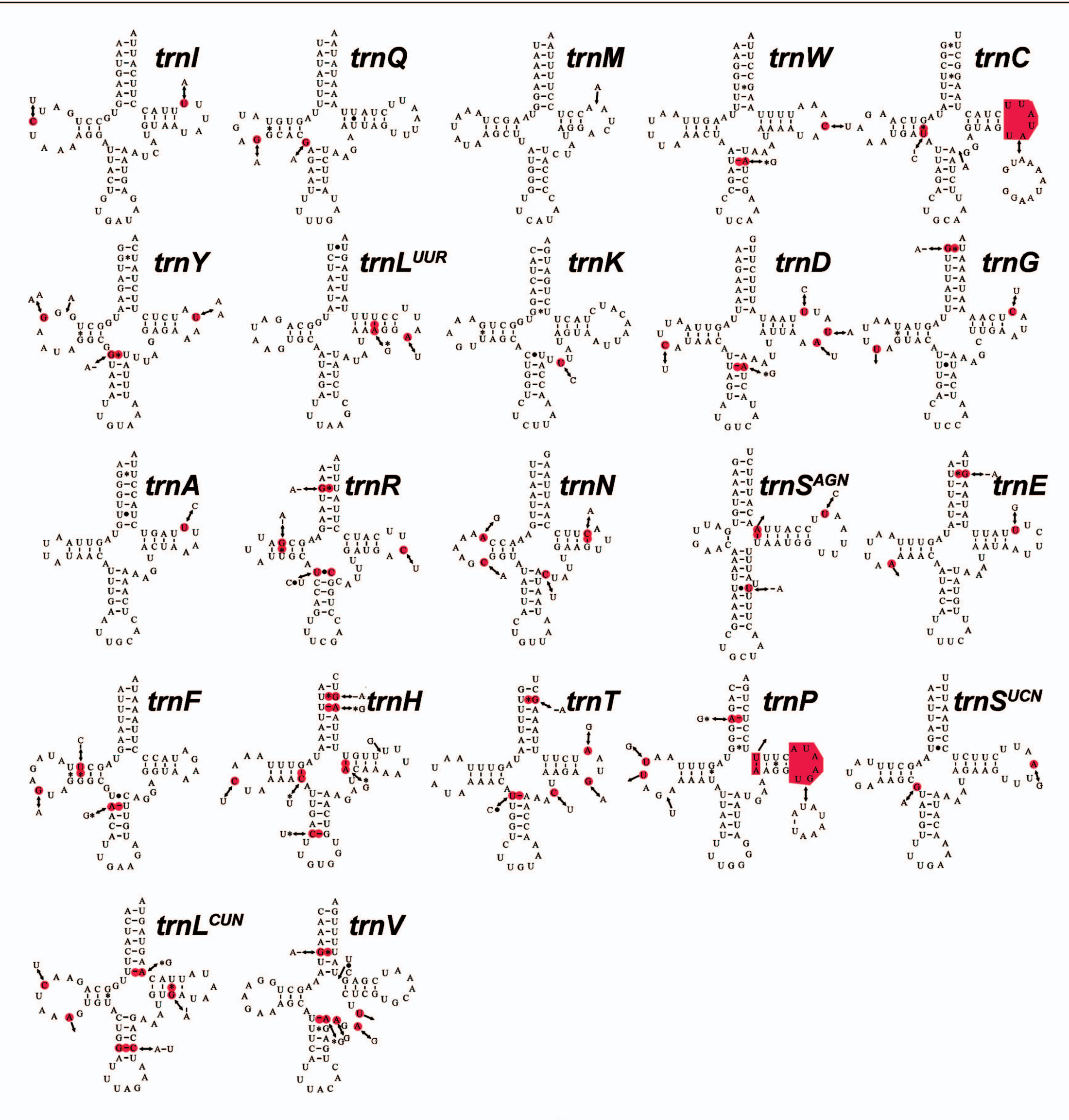


图 1　纺织娘和日本纺织娘线粒体基因组 tRNA 二级结构变化

Fig. 1　Variations of the secondary structures of mitogenome tRNAs between *Mecopoda elongata* and *M. niponensis*

图中给出纺织娘 tRNA 二级结构，与日本纺织娘相比，变化的部分以阴影标出。Cloverleaf structures of *M. elongata* tRNAs are presented, whereas modified parts compared with *M. niponensis* are marked by shadow.

2.4　2 种纺织娘线粒体基因组的控制区

2 种纺织娘线粒体基因组的控制区均介于 *rrnS* 和 tRNA 簇(*trnI-trnQ-trnM*)之间，长度及 A + T 含量分别为：纺织娘 294 bp，71.5%；日本纺织娘 393 bp，69.5%。线粒体基因组控制区 A + T 含量均略低于其他区域。进一步序列分析，没有发现明显的“(TA)n”、“poly-A stretch”等保守序列模块。

3　讨论

本研究测定的 2 种纺织娘线粒体基因组全序列长度分别为：纺织娘 15 284 bp，日本纺织娘 15 364 bp。在目前已报道的直翅目昆虫线粒体基因组中，其长度仅稍长于草螽亚科的疑钩额螽 14 971 bp 和蚁蟋 *Myrmecophilus manni* 15 324 bp (仅日本纺织娘)(Zhou *et al*., 2007；Fenn *et al*., 2008)。基因组的基因含量及相对位置均与已报道的螽亚目螽斯科的其他种类一致(Fenn *et al*., 2007, 2008；Zhou *et al*., 2007, 2008, 2009, 2011；Yang *et al*., 2012)。与蝗亚目不同之处在于，蝗亚目昆虫中 *trnK/trnD* 发生转位现象，*trnD* 位于 *trnK* 上游 (黄原等，2010)。

2 种纺织娘线粒体基因组的碱基组成均具有明显的 AT 偏向性，其 A + T 含量分别为 71.8% (纺织娘)和 72.4%(日本纺织娘)，均处于已报道的直翅目昆虫线粒体基因组 A + T 含量范围之内，含量

最低的为螽亚目螽斯亚科优雅蝈螽，仅 65.3%（Zhou *et al.*，2008）；最高的为蝗亚目威廉剑角蝗 *Acrida willemsei*，高达 76.2%（Fenn *et al.*，2008）。基因组不同区域 A+T 含量比较发现：除控制区以外，纺织娘线粒体基因组其他区域均略低于日本纺织娘，其中，相差最大的区域为蛋白质编码基因密码子第 3 位点，相差 1.2%；纺织娘控制区 A+T 含量超出日本纺织娘 1.9%；总体而言，两者碱基组成基本一致。

2 种纺织娘中，*nad*2，*nad*1 和 *cox*1 均没有发现典型的 ATN 起始密码子。关于 *cox*1 的起始密码子有许多特殊密码子被提出，如 ACC（Yamauchi *et al.*，2004）、CCG（Fenn *et al.*，2007；Zhang and Huang，2008）、TTA（Nardi *et al.*，2001；Zhou *et al.*，2007，2010）等，此外还存在四联体起始密码子 ATAA（Flook *et al.*，1995；Crease，1999）、ATCA（Hickerson and Cunningham，2000）等。Sheffield 等（2010）通过序列比对发现，在 21 个已测的直翅目昆虫线粒体基因组 *cox*1 起始区及前面紧邻的 *trnY* 区域存在 4 bp 的保守核苷酸序列 ATGA，并据此推测 *cox*1 的起始密码子为四联体起始密码子 ATGA，在此，我们认为将 ATGA 作为 2 种纺织娘 *cox*1 的起始密码子也是可行的。*nad*2 和 *nad*1 以罕见的 TTG 作为起始密码子，类似的情况此前已有报道，如：在窗萤 *Pyrocoelia rufa*（Bae *et al.*，2004）、蠹虫 *Tricholepidion gertschi*（Nardi *et al.*，2003）、四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus*（Mitchell *et al.*，1993）线粒体基因组中 *nad*1 均以 TTG 作为起始密码子；此外，在东方蝼蛄 *Gryllotalpa orientalis* 线粒体基因组中 *nad*2 以 GTG 作为起始密码子（Kim *et al.*，2005）。

2 种纺织娘线粒体基因组中蛋白质编码基因的密码子使用均存在显著的密码子使用偏向性。NNU 和 NNA 密码子偏好使用与蛋白质编码基因密码子第 3 位的高 AT 偏向性相适应。本研究结果为螽斯科系统发生关系重建积累了有价值的数据资料。

References

Bae JS，Kim I，Sohn HD，Jin BR，2004. The mitochondrial genome of the firefly，*Pyrocoelia rufa*：complete DNA sequence，genome organization，and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*，32(3)：978－985.

Boore JL，1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*，27(8)：1767－1780.

Clary DO，Wolstenholme DR，1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*：nucleotide sequence，gene organization，and genetic code. *J. Mol. Evol.*，22：252－271.

Crease TJ，1999. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex*（Cladocera：Crustacea）. *Gene*，233(1－2)：89－99.

Crozier RH，Crozier YC，1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*：complete sequence and genome organization. *Genetics*，133(1)：97－117.

Fenn JD，Cameron SL，Whiting MF，2007. The complete mitochondrial genome sequence of the Mormon cricket（*Anabrus simplex*：Tettigoniidae：Orthoptera）and an analysis of control region variability. *Insect Mol. Biol.*，16(2)：239－252.

Fenn JD，Song H，Cameron SL，Whiting MF，2008. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera（Insecta）and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Mol. Phylogenet. Evol.*，49(1)：59－68.

Flook PK，Rowell CH，Gellissen G，1995. The sequence，organization，and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*，41(6)：928－941.

Folmer O，Black M，Hoeh W，Lutz R，Vrijenhoek R，1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*，3(5)：294－299.

Friedrich M，Muqim N，2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mol. Phylogenet. Evol.*，26(3)：502－512.

Gellissen G，Bradfield JY，White BN，Wyatt GR，1983. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. *Nature*，301(5901)：631－634.

Hickerson MJ，Cunningham CW，2000. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus*（Crustacea，Anomura）. *Mol. Biol. Evol.*，17：639－644.

Huang Y，Liu N，Lu HM，2010. Research progress in mitochondrial genomes of the Orthoptera insects. *Acta Entomol. Sin.*，53(5)：581－586. [黄原，刘念，卢慧甍，2010. 直翅目昆虫线粒体基因组研究进展. 昆虫学报，53(5)：581－586]

Kim I，Cha SY，Yoon MH，Hwang JS，Lee SM，Sohn HD，Jin BR，2005. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket，*Gryllotalpa orientalis*（Orthoptera：Gryllotalpidae）. *Gene*，353(2)：155－168.

Lee ES，Shin KS，Kim MS，Park H，Cho S，Kim CB，2006. The mitochondrial genome of the smaller tea tortrix *Adoxophyes honmai*（Lepidoptera：Tortricidae）. *Gene*，373：52－57.

Liu N，Hu J，Huang Y，2006. Amplification of grasshoppers complete mitochondrial genomes using long PCR. *Chinese Journal of Zoology*，41(2)：61－65. [刘念，胡婧，黄原，2006. 应用长 PCR 扩增蝗虫线粒体全基因组. 动物学杂志，41(2)：61－65]

Lu C，Liu YQ，Liao SY，Li B，Xiang ZH，Han H，Wang XG，2002. Complete sequence determination and analysis of *Bombyx mori* mitochondrial genome. *J. Agric. Biotechnol.*，10(2)：163－170. [鲁成，刘运强，廖顺尧，李斌，向仲怀，韩华，王学刚，2002.

家蚕线粒体基因组全序列测定与分析. 农业生物技术学报, 10 (2): 163 – 170]

Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA, 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*, 36: 1058 – 1073.

Nardi F, Carapelli A, Fanciulli PP, Dallai R, Frati F, 2001. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetrodontophora bielanensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Mol. Biol. Evol.*, 18(7): 1293 – 1304.

Nardi F, Spinsanti G, Boore JL, Carapelli A, Dallai R, Frati F, 2003. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science*, 299: 1887 – 1889.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T, 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4): 1695 – 1705.

Sheffield NC, Hiatt KD, Valentine MC, Song H, Whiting MF, 2010. Mitochondrial genomics in Orthoptera using MOSAS. *Mitochondrial DNA*, 21(3 – 4): 87 – 104.

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37(1): 545 – 579.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651 – 701.

Staden R, Beal KF, Bonfield JK, 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.*, 132: 115 – 130.

Steinberg S, Leclerc F, Cedergren R, 1997. Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J. Mol. Biol.*, 266: 269 – 282.

Tamura K, Aotsuka T, 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.*, 26(11/12): 815 – 819.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596 – 1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876 – 4882.

Wolstenholme DR, 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173 – 216.

Yamauchi MM, Miya MU, Nishida M, 2004. Use of a PCR-based approach for sequencing whole mitochondrial genomes of insects: two examples (cockroach and dragonfly) based on the method developed for decapod crustaceans. *Insect Mol. Biol.*, 13(4): 435 – 442.

Yang MR, Zhou ZJ, Chang YL, Zhao LH, 2012. The mitochondrial genome of the quiet-calling katydids, *Xizicus fascipes* (Orthoptera: Tettigoniidae: Meconematinae). *J. Genet.*, 91(2): 141 – 153.

Zhang CY, Huang Y, 2008. Complete mitochondrial genome of *Oxya chinensis* (Orthoptera, Acridoidea). *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 40(1): 7 – 18.

Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM, 2007. The mitochondrial genome of *Ruspolia dubia* (Orthoptera: Conocephalidae) contains a short A + T-rich region of 70 bp in length. *Genome*, 50(9): 855 – 866.

Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM, Ye HY, 2009. The complete mitochondrial genome of *Deracantha onos* (Orthoptera: Bradyporidae). *Mol. Biol. Rep.*, 36: 7 – 12.

Zhou ZJ, Shang N, Huang Y, Shi FM, Wei SZ, 2011. Sequencing and analysis of the mothchondrial genome of *Conocephalus maculatus* (Orthoptera: Conocephalinae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(5): 548 – 554. [周志军, 尚娜, 黄原, 石福明, 韦仕珍, 2011. 斑翅草螽线粒体基因组序列测定与分析. 昆虫学报, 54(5): 548 – 554]

Zhou ZJ, Shi FM, Huang Y, 2008. The complete mitogenome of the Chinese bush cricket, *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigonioidea). *J. Genet. Genomics*, 35: 341 – 348.

Zhou ZJ, Ye HY, Huang Y, Shi FM, 2010. The phylogeny of Orthoptera inferred from mtDNA and description of *Elimaea cheni* (Tettigoniidae: Phaneropterinae) mitogenome. *J. Genet. Genomics*, 37(5): 315 – 324.

(责任编辑: 赵利辉)